木芙蓉三个品种及近缘种的叶绿体基因组比较分析

李镇兵[1]，任婷[1]，邓姣姣[1]，陈俊佩[1]，周颂东[1*]，曾心美[2]，马娇[2]，李方文[2]

(1. 四川大学 生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室，成都 610065；2. 成都市植物园，成都 610083)

摘　要： 木芙蓉 (*Hibiscus mutabilis*) 栽培历史悠久，是原产中国的古老园林树种和药用植物。为探讨木芙蓉品种及近缘种的进化特征，厘清木芙蓉品种间及其与近缘种间的亲缘关系，同时也为探究木芙蓉叶绿体基因组 (chloroplast DNA, cp DNA) 的遗传方式，该文选择了一个杂交组合中的 3 个木芙蓉栽培品种（‘单瓣白’、‘金秋颂’、‘牡丹粉’），用高通量测序平台 Illumina NovaSeq 对其叶绿体基因组进行首次测序。经组装注释后得到 3 条完整的 cp DNA 序列，结合本团队已经完成的近缘种台湾芙蓉(*H. taiwanensis*)和来自基因库的木槿、朱槿的 cp DNA，该文对木槿属 4 种及木芙蓉种下的 3 个品种进行了 cp DNA 组成和结构特征的比较分析，并完成了其系统发育树重建。结果表明：(1)‘单瓣白’、‘金秋颂’、‘牡丹粉’的叶绿体基因组序列长度分别为 160 880、160 879、160 920 bp，基因数目均为 130 个，其中 85 个蛋白编码基因、8 个核糖体 RNA 和 37 个转运 RNA。(2)比较分析表明，木芙蓉的种下 3 个品种及其近缘种台湾芙蓉在叶绿体基因组上高度保守，反向重复区(IR)均为 26 300 bp；木槿和朱槿在 IR 区发生了收缩，分别为 25 745 和 25 598 bp。(3)系统发育分析表明，种下 3 个品种聚成一个单系支，再与台湾芙蓉聚成一个高支持率分支，表明木芙蓉和台湾芙蓉的亲缘关系最近；相较于木槿和朱槿，木芙蓉、台湾芙蓉两种与海滨木槿、黄槿、大麻槿在亲缘关系上更近。(4)木芙蓉 3 个品种之间能通过叶绿体基因组序列区分开，在大/小单拷贝区（LSC/SSC）长度上，‘单瓣白’、‘金秋颂’、‘牡丹粉’分别为 89 355 bp/18 925 bp、89 353 bp/18 926 bp、89 400 bp/18 920 bp，且从重复序列和核苷酸多样性分析中开发出了候选分子标记和 DNA 条形码，可以作为品种鉴定的分子条码。(5)木芙蓉品种单瓣白与金秋颂叶绿体基因组差异最小，亲缘关系最近，根据两者母本与子代的关系，证明了木芙蓉叶绿体基因组的母系遗传特征。该文有助于我们更好地了解 3 个木芙蓉品种及台湾芙蓉叶绿体基因组的进化特征和物种间的系统发育关系，并为木芙蓉品种的准确鉴定和优良品种选育提供了叶绿体基因组方面的基础资料。

关键词： 木芙蓉，台湾芙蓉，叶绿体基因组，分子标记，系统发育树

中图分类号： Q943　　　　**文献标识码：** A

Comparative analysis of the chloroplast genomes of three cultivars of *Hibiscus mutabilis* and its related species

LI Zhenbing[1], REN ting[1], DENG Jiaojiao[1], CHEN Junpei[1], ZHOU Songdong[1*], ZENG Xinmei[2], MA Jiao[2], LI Fangwen[2]

(1. *College of Life Sciences*, *Sichuan University*, *Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education*, Chengdu 610065, China; 2. *Chengdu Institute of Landscape Architecture*, Chengdu 610083, China)

Abstract: *Hibiscus mutabilis* is native to China with a long cultivation history, and is an ancient garden tree species and medicinal plant. In this study, we selected three cultivars of *H. mutaibilis* in a hybrid combination (*H. mutabilis* cv. Danbanbai, *H. mutabilis* cv. Jinqiusong, *H. mutabilis* cv. Mudanfen) to investigate evolutionary characteristics between the cultivars of *Hibiscus* and its related species, and clarify the phylogenetic relationship

---

基金项目： 国家自然科学基金(32170209)；成都市植物园木芙蓉组织培养和分子育种研究项目(18H0567)；国家植物标本资源库-四川大学标本馆的数字化与共享平台(00204054A9016) [Supported by National Natural Science Foundation of China(32170209); Tissue Culture and Molecular Breeding of *Hibiscus mutabilis* in Chengdu Botanical Garden(18H0567); National Plant Herbarium Resource Bank-Digital and Sharing Platform of the Herbarium of Sichuan University(00204054A9016)]。

作者简介： 李镇兵(1995-)，硕士研究生，从事野生植物资源保护与利用研究，(E-mail)1183363799@qq.com。

[*]**通信作者：** 周颂东，博士，副教授，从事植物系统发育与分子进化研究，(E-mail)zsd@scu.edu.cn

between the cultivars of *Hibiscus* and with its related species, as well as explore the genetic model of cp DNA of *H. mutaibilis* at the same time. We first sequenced the three cultivars of *H. mutaibilis* using Illumina NovaSeq. After assembly and annotation, three complete chloroplast genome sequences were obtained. The cp DNA of the related species *H. taiwanensis* from our group, and *H. syricus* and *H. rosa-sinensis* from the gene bank. Then we carried out comparative analysis on composition and structure of cp DNA of 4 species of *Hibiscus* and 3 cultivars of *H. mutabilis*, and completed its phylogenetic tree reconstruction. The results were as follows: (1) Total size of chloroplast genomes of *H. mutabilis* cv. Danbanbai, *H. mutabilis* cv. Jinqiusong, *H. mutabilis* cv. Mudanfen was 160 880, 160 879, 160 920 bp, respectively, and the total gene number was 130, including 85 protein-coding genes, eight ribosomal RNAs, and 37 transfer RNAs. (2) The comparative analyses showed that the cp DNA of three cultivars of *H. mutabilis* and the related species *H. taiwanensis* were highly conserved, and the inverted repeat regions (IR) were all 26 300 bp; *H. rosa-sinensis* and *H. syriacus* shrank to at 25 745 and 25 598 bp, respectively. (3) The phylogenetic analysis revealed that the three cultivars were planted into a monophyletic branch, and then together with *H. taiwanensis* into a high support branch, indicating that *H. mutabilis* and *H. taiwanensis* had the closest relationship; Compared with *H. syriacus* and *H. rosa-sinensis*, *H. mutabilis* and *H. taiwanensis* were more closely related to *H. hamabo*, *H. tiliaceum* and *H. canabinus.* (4) Three cultivars of *H. mutabilis* could be distinguished by chloroplast genome sequence, the length of LSC/SSC of *H. mutabilis* cv. Danbanbai, *H. mutabilis* cv. Jinqiuson*g*, *H. mutabilis* cv. Mudanfen were 89 355 bp/18 925 bp, 89 353 bp/18 926 bp, 89 400 bp/18 920 bp, respectively. And candidate molecular markers and DNA barcodes had been developed from repeat sequence and nucleotide diversity analyses, which could be used as a tool for cultivars identification. (5) The chloroplast genomes of *H. mutabilis* cv. Danbanbai and *H. mutabilis* cv. Jinqiusong showed a minimum difference and had the closest phylogenetic relationship. According to the relationship between their female and offspring, the maternal genetic characteristics of the chloroplast genome of *Hibiscus* were proved. This study will help us to understand the evolutionary characteristics and phylogenetic relationship of chloroplast genomes of three cultivars of *H. mutabilis* and *H. taiwanensis*, and provide basic data on chloroplast genome for accurate identification of the cultivars of *H. mutabilis* and breeding of excellent cultivars.

Keywords: *Hibiscus mutabilis*, *Hibiscus taiwanensis*, chloroplast genome, molecular marker, phylogenetic relationship

木芙蓉 (*Hibiscus mutabilis*) 别名拒霜花，属锦葵科木槿属，原产于中国，在东亚及东南亚地区均有分布。其花大色艳且花期较长 (杨苑钊等，2019)。木芙蓉具有较强的固碳、释氧、降温的能力，在城市园林中具有重要的应用价值 (郑鹏等, 2012)。成都市植物园长期以来致力于市花木芙蓉的研究及应用，并培育了许多抗病抗虫品种和不同花期的品种 (王莹，2017)。但长期以来的人工选育和自然杂交导致木芙蓉品种间遗传关系错综复杂、亲缘关系不明、分类和进化关系模糊。对木芙蓉进行品种分类以及探讨其亲缘关系，对于木芙蓉品种间杂交以及新品种的选育具有重要意义 (张露等，2021)。台湾芙蓉 (*Hibiscus taiwanensis*) 别名狗头芙蓉或山芙蓉，亦属于木槿属，原产于台湾阿里山，是当地特有的原生种 (Lim, 2014)。据中国植物志记载，台湾芙蓉非常类似于木芙蓉，区别仅为前者全株具糙硬毛和粗糙的毛被，而后者全株为星状绒毛，因此，有学者提出两者可能不是明确的两个种 (冯国楣，1984)。此外，木芙蓉与台湾芙蓉很容易杂交，坐果率为 57.89%，这与木芙蓉品种之间杂交的坐果率 62.5%相差无几，而木芙蓉与朱槿杂交坐果率为 8.33%，与木槿杂交成功率更低，这在某种程度上也反映了亲缘关系的远近。遗传信息不足通常使我们无法充分了解栽培植物和近缘种，明确栽培种和野生近缘种之间的遗传变异对将近缘种的有利性状引入栽培品种至关重要(Amar et al., 2019)。因此，我们需要开发更多的遗传信息，以便能够比较栽培种的遗传差异，并快速和准确地鉴定它们，从而更有效地利用这些物种。

叶绿体基因组(cp DNA)大小为 75～250 kb，大多数植物的 cp DNA 由大约 120 个基因组成，包括转运 RNA (tRNA)、核糖体 RNA (rRNA) 和蛋白质编码基因(protein-coding gene, PCGs)(Daniell et al., 2016)。cp DNA 因结构简单、高度保守、拷贝数多而分子量少的特点，已被应用于分子标记开发和系统发育等研究中(杨俏俏等，2019)。越来越多的研究表明叶绿体基因工程在植物遗传改良方面具有很大优势，叶绿体也已经成为植物遗传转化的新工具(母连胜等，2017)。前人关于木芙蓉的研究大多集中在木芙蓉栽培育种(王莹，2017；石小庆等，2021)和化学成分上(蔡露等，2021; 王艺等，2021)，鲜少有关于木芙蓉品种间以及与其近缘种间亲缘关系的研究。近年来，有学者在木芙蓉和台湾芙蓉的叶绿体基因组分析和亲缘关系研究

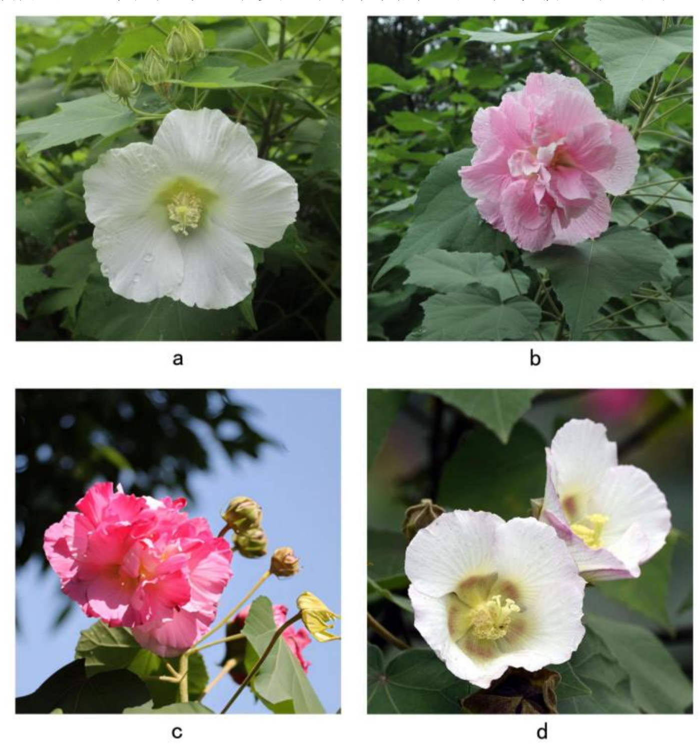
上取得了一定的进展，Abdullah 等(2021)第一次对包括木芙蓉在内的三个物种的 cp DNA 进行了测序和比较分析，但其研究对象为整个锦葵科的 3 个不同属植物，范围偏大。本团队的许新锐等（2020）对台湾芙蓉的叶绿体基因组进行了报道；张璐等(2021)采用扫描电镜观察了一些木芙蓉品种的花粉显微结构，并探讨了其分类学意义。花粉稳定性极强，在一定程度上能反映植物演化和亲缘关系，并对物种鉴定有一定的分类价值(彭焕文等，2018)，但基因组层面的分子数据具有海量的遗传信息，通常认为与基因组层面的研究相结合有助于更精确和深入地进行亲缘关系和物种鉴定的研究。而至今为止公布的木芙蓉品种的遗传信息很少，且未有对木芙蓉品种间及其与近缘种台湾芙蓉间的 cp DNA 相关研究。这就极大阻碍了木芙蓉品种的系统发育和优良性状改良研究。由于 cp DNA 并非都是母系遗传，只是在大多数被子植物中为母系遗传，在裸子植物中则主要为父系遗传，此外，少部分被子植物的 cp DNA 存在父系遗传和双亲遗传的现象(Neale & Sederoff, 1989)，所以为了探索木芙蓉的 cp DNA 遗传方式，我们选取一个杂交组合中的 3 个木芙蓉品种，首次对木芙蓉品种及其近缘种台湾芙蓉叶绿体基因组进行比较分析和系统发育分析。

本研究拟探讨以下科学问题：(1)木芙蓉 3 个品种及其近缘种台湾芙蓉叶绿体基因组有什么进化特征？(2)木芙蓉与其近缘种间有怎样的亲缘关系？(3)在叶绿体基因组的组成和结构方面，能否开发出品种鉴定的分子标记或 DNA 条形码？(4) 探究木芙蓉 cp DNA 的遗传方式。本研究将为木芙蓉的品种鉴定、进化研究和植物遗传改良、优良品种选育提供重要的第一手遗传资料。

1 材料与方法

1.1 木芙蓉品种材料来源

3 个木芙蓉品种采自成都市植物园(104°8′11″ E、30°45′52″ N)，分别为‘单瓣白’(*H. mutabilis* cv. Danbanbai)、‘金秋颂’(*H. mutaibilis* cv. Jinqiusong)、‘牡丹粉’(*H. mutabilis* cv. Mudanfen)。这三个品种为杂交组合，其中‘单瓣白’是母本，‘牡丹粉’是父本，‘金秋颂’为子一代，这样有利于对木芙蓉叶绿体的遗传方式进行探讨。从生态特性来看，‘单瓣白’和‘牡丹粉’为早花品种，花期为 6—9 月，‘金秋颂’为中花品种，花期为 9—10 月。从形态上来看，‘金秋颂’为重瓣花，雄蕊退化，有子房但不结实，另外两种结实。‘单瓣白’为单瓣花，花白色，‘牡丹粉’和‘金秋颂’分别为粉色和红色。‘牡丹粉’的花型似牡丹，且平均花径比前两者大。近缘种台湾芙蓉的花期始于 10 月下旬，结实，花为单瓣，白中带粉。花的形态见图版I所示。



a. ‘单瓣白’；**b.** ‘牡丹粉’；**c.** ‘金秋颂’；**d.** 台湾芙蓉。

a. *H. mutabilis* cv. Danbanbai; **b**. *H. mutabilis* cv. Mudanfen; **c**. *H. mutabilis* cv. Jinqiusong; **d**. *H. taiwanensis*.

图版 I　3 个木芙蓉品种和台湾芙蓉花的形态特征

Plate I Morphological characters of flowers of three cultivars of *Hibisucs mutabilis* and *H. taiwanensis*

1.2 基因组 DNA 的提取和测序

采集 3 个木芙蓉品种新鲜健康的叶片，用改良 CTAB 法从叶片组织中提取总基因组 DNA。使用 1%琼脂糖凝胶电泳和荧光染料 (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit)评估 DNA 产物的质量和浓度。采用 Illumina TruSeq Nano DNA LT 文库制备实验流程构建插入片段大小(insert size)为 400 bp 的 DNA 文库。应用 Illumina NovaSeq 平台对 DNA 文库进行二代测序(paired-end, 2×150 bp)。DNA 提取及测序工作均在南京派森诺基因科技有限公司完成。

1.3 叶绿体基因组的组装和注释

每个物种得到至少 5G 的原始数据(raw data), 经过数据过滤后，首先使用 NOVOPlasty (Dierckxsens et al., 2017)软件 (k-mer = 39) 进行组装拼接，选择台湾芙蓉的 *rbcL* 基因作为种子序列 (seed sequence)。然后利用在线程序 GeSeq(Tillich et al., 2017)注释叶绿体基因组序列，并用 Geneious v9.0.2(Kearse et al., 2012)进行手动校正，最后将带有注释信息的 3 条序列上传至 NCBI 数据库，‘单瓣白’、‘金秋颂’、‘牡丹粉’的序列号分别为 MZ846191、MZ846192、MZ855502。借助在线程序 Oranellar Genome DRAW(Greiner et al., 2019)绘制叶绿体基因组的物理图谱。台湾芙蓉的序列号为 MK937807，亦为本研究项目的成果(Xu et al., 2019)。本文中用到的其他叶绿体基因组序列均下载于 NCBI，其详细信息见表 1。

1.4 叶绿体基因组比较分析

使用 MISA(MicroSatellite identification tool)(Beier et al., 2017)识别木芙蓉 3 个品种、台湾芙蓉、木槿、朱槿基因组中的微卫星序列 (SSRs)。参数设置：单核苷酸(mono)、双核苷酸 (di)、三核苷酸 (tri)、四核苷酸 (tetra)、五核苷酸 (penta)、六核苷酸 (hexa) SSR 的最小重复次数分别为 10、5、4、3、3、3。利用 REPuter(Kurtz et al., 2001)来分析木芙蓉 3 个品种和台湾芙蓉叶绿体基因组中的重复类型(Hamming 距离设置为 3，重复序列的最小长度限制为 30)。借助 IRscope (Amiryousefi et al., 2018)绘制木芙蓉 3 个品种、台湾芙蓉、木槿和朱槿叶绿体基因组 IR 边界的扩张和收缩。使用 mVISTA(Mayor et al., 2000)中的 Shuffle-LANGAN 模式对木芙蓉 3 个品种、台湾芙蓉、木槿、朱槿的叶绿体基因组序列进行全局比对，以评估序列之间的相似性。并用 DNAsp6(Librado & Rozas, 2009)软件计算序列之间的核苷酸多态性。使用 Geneious v9.02(Kearse et al., 2012)分别提取每个物种的蛋白编码区域(CDS)，存在多拷贝的基因仅保留一条，然后用 Codon W(Sharp & Li, 1987)计算这些 CDSs 的同义密码子的相对使用度(related synonymous codon usage, RSCU)。

1.5 系统发育分析

使用 phylosuite(Zhang et al., 2020)软件提取 17 个物种叶绿体基因组的 CDSs，删去重复基因和非共有的基因后，用 MAFFT 对序列进行比对，而后用 MACSE 优化序列，接着用 Gblock 修剪比对好的序列，最后用 concatenate 功能将序列串联。使用 Modeltest 软件检测最佳核苷酸替代模型为 JC+I+G。使用 MrBayes 软件进行贝叶斯(bayesian inference, BI)分析。基于 Markov chain Monte Carlo (MCMC)算法，运行一千万代，每 1 000 代取一棵树，前 20%的树当作老化样本丢弃，剩余的树用于构建一致树。使用 IQtree 进行最大似然法(maximum likelihood, ML)分析，重复次数为 1 000。最后将建树结果用在线程序 iTOL(Ivica & Peer, 2021)进行美化。

表 1 本研究所选用的物种名称和 GenBank 序列编号

Table 1 Names and GenBank sequence numbers of the plant species selected in this study

物种 Species	序列编号 Accession number	物种 Species	序列编号 Accession number
木槿 *Hibiscus syriacus*	KR259989	桐棉 *Thespesia populnea*	NC048518
朱槿 *H. rosa-sinensis*	NC042239	苘麻 *Abutilon theophrasti*	NC053702
大麻槿 *H. canabinus*	NC045873	蜀葵 *Alcea rosea*	NC053839
黄槿 *H. tiliaceum*	MT644160	野葵 *Malva verticillata*	MT106775

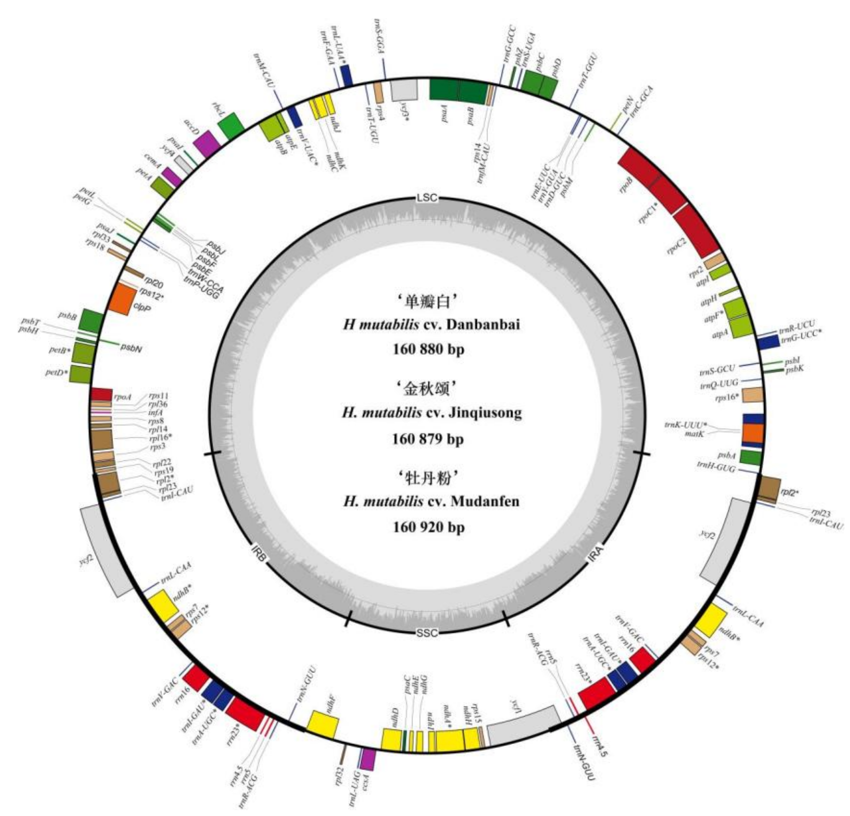
海滨木槿	NC030195	拔毒散	NC051877
H. hamabo		*Sida szechuensis*	
海岛棉	NC008641	美丽异木棉	MK820674
Gossypium barbadense		*Ceiba speciosa*	
G. thurberi	GU907100		

2 结果与分析

2.1 叶绿体基因组基本特征

如图 1 所示，‘单瓣白’和‘金秋颂’的长度差异较小，分别为 160 880 和 160 879 bp，仅相差一个碱基，而‘牡丹粉’的长度与前两种则有稍大的差异，为 160 920 bp。三者的 cp DNA 呈现出典型的四分体环状结构，均由一对反向重复区 (IRa 和 IRb，长度均为 26 300 bp) 以及一个大单拷贝区 (LSC，长度分别为 89 355、89 353、89 400 bp) 和一个小单拷贝区 (SSC，长度分别为 18 925 bp、18 926 bp、18 920 bp) 组成。从表 2 可以看出台湾芙蓉的 LSC 区长度亦明显长于 3 个木芙蓉品种，而在品种内部，‘单瓣白’与‘金秋颂’的 LSC 区与 SSC 区长度仅相差 1～2 bp，但与‘牡丹粉’相差较大。

木芙蓉的叶绿体基因组一共有 130 个基因，包含 85 个蛋白编码基因 (PCGs)、37 个 tRNA 和 8 个 rRNA。大多数基因以单拷贝形式出现于 LSC 区或 SSC 区中，其中 SSC 区中有 13 个基因，包括 12 个 PCGs (*ndhF*、*rpl*32、*ccsA*、*ndhD*、*psaC*、*ndhE*、*ndhG*、*ndhI*、*ndhA*、*ndhH*、*rps*15、*ycf*1) 和 1 个 tRNA (*trnL-UAG*)，LSC 区中有 85 个基因，包括 63 个 PCGs 和 22 个 tRNA。仅有 17 个基因在 IR 区重复，包括 6 个 PCGs (*rpl*2、*rpl*23、*ycf*2、*ndhB*、*rps*7、*rps*12)、7 个 tRNA (*trnI-CAU*、*trnL-CAA*、*trnV-GAC*、*trnI-GAU*、*trnA-UGC*、*trnR-ACG*、*trnN-GUU*)和 4 个 rRNA (*rrn*16、*rrn*23、*rrn*4.5、*rrn*5)。*ycf*1 基因跨越 SSC 区和 IR 区，*rps*12 基因第一个外显子位于 LSC 区，其他两个外显子位于 IRs 区。17 个基因有一个内含子，*ycf*3 和 *clpP* 基因有两个内含子。所有基因按照基本功能划分为表达相关基因、光合作用相关基因和其他基因三类，每类基因的名称和数量展示在表 3 中。



1. 光合系统 I；**2.** 光合系统II；**3.** 胞色素复合物；**4.** ATP 合成酶；**5.** NADH 脱氢酶；**6.** 核酮糖二磷酸羧化酶大亚基；**7.** RNA 聚合酶；**8.** 核糖体蛋白小亚基(SSU)；**9.** 核糖体蛋白大亚基(LSU)；**10.** 转运 RNAs；**11.** 核糖体 RNAs；**12.** *clpP*、*matK* 基

因；**13**. 其他基因；**14**. 假设的叶绿体阅读框(*ycf*)。

1. Photosystem I; **2**. Photosystem II; **3**. Cytochrome b/f complex; **4**. ATP synthase; **5**. NADH dehydrogenase; **6**. RubisCO large subunit; **7**. RNA polymerase; **8**. Ribosomal proteins (SSU); **9**. Ribosomal proteins (LSU); **10**. Transfer RNAs; **11**. Ribosomal RNAs; **12**. *clpP*, *matK*; **13**. Other genes; **14**. Hypothetical chloroplast reading flames (*ycf*)。

图 1 木芙蓉叶绿体基因组物理图谱

Fig. 1 Physical map of *Hibiscus mutabilis chloroplast*

表 2 木槿属 4 个种（包含木芙蓉 3 个品种）叶绿体基因组基本特征比较

Table 2 Comparison of chloroplast genomes among four species of *Hibiscus* (including three cultivars of *H. mutabilis*)

木槿属 *Hibiscus*	长度 Size (bp)/ GC 含量 GC content (%)				基因数目 Number of gene			
	全基因组 Genome	小单拷贝区 SSC	大单拷贝区 LSC	反向重复区 IR	总和 Total	蛋白编码基因 PCGs	核糖体 RNA/rRNA	转运 RNA/tRNA
‘单瓣白’ *H. mutabilis* cv. Danbanbai	160 880/36.9	18 925/31.5	89 355/34.7	26 300/42.6	130	85	8	37
‘金秋颂’ *H. mutabilis* cv. Jinqiusong	160 879/36.9	18 926/31.5	89 353/34.7	26 300/42.6	130	85	8	37
‘牡丹粉’ *H. mutabilis* cv. Mudanfen	160 920/36.9	18 920/31.5	89 400/34.7	26 300/42.6	130	85	8	37
台湾芙蓉 *H. taiwanensis*	161 056/36.9	18 918/31.5	89 538/34.7	26 300/42.6	130	85	8	37
朱槿 *H. rosa-sinensis*	160 951/37.0	20 246/31.3	89 509/34.9	25 598/42.9	130	85	8	37
木槿 *H. syriacus*	161 022/36.8	19 831/31.1	89 701/34.7	25 745/42.8	130	85	8	37

表 3 木芙蓉叶绿体基因组的基因信息

Table 3 List of genes in the chloroplast genome *Hibiscus mutabilis*

基因类型 Gene category	基因分组 Group of gene	基因名称 Name of gene	数量 Number
表达相关基因 Self-replication	核糖体大亚基基因 Large subunit of ribosome gene	*rpl*2a*，23a，32，22，16*，14，36，20，33	11
	核糖体小亚基基因 Small subunit of ribosome gene	*rps*7a，15，19，3，8，11，12a*，18，4，14，2，16*	14
	RNA 聚合酶亚基基因 DNA-dependent RNA polymerase gene	*rpoA*，*rpoB*，*rpoC*1*，*rpoC*2	4
	核糖体 RNA 基因 Ribosomal RNA gene	*rrn*16a，*rrn*23a，*rrn*4.5a，*rrn*5a	8
	转运 RNA 基因 Transfer RNA gene	*trnI-CAU*a，*trnL-CAA*a，*trnV-GAC*a，*trnA-UGC*a*，*trnR-ACG*a，*trnI-GAU*a*，*trnN-GUU*a，*trnL-UAG*，*trnP-UGG*，*trnW-CCA*，*trnM-CAU*，*trnV-UAC**，*trnF-GAA*，*trnL-UAA**，*trnT-UGU*，*trnS-GGA*，*trnfM-CAU*，*trnG-GCC*，*trnS-UGA*，*trnT-GGU*，*trnE-UUC*，*trnY-GUA*，*trnD-GUC*，*trnC-GCA*，*trnR-UCU*，*trnG-UCC**，*trnS-GCU*，*trnQ-UUG*，*trnK-UUU**，*trnH-GUG*	37

光合作用 Photosynthesis	光合系统I基因 Photosystem I gene	*psaC*，*J*，*I*，*A*，*B*	5
	光合系统II基因 Photosystem II gene	*psbH*，*N*，*T*，*B*，*E*，*F*，*L*，*J*，*Z*，*C*，*D*，*M*，*I*，*K*，*A*	15
	NADH 氧化还原酶亚基基因 Subunits of NADH-dehydrogenase gene	*ndhB*a*，*H*，*A**，*I*，*G*，*E*，*D*，*F*，*C*，*K*，*J*	12
	细胞色素复合物亚基基因 Subunits of cytochromeb/f complex gene	*petD**，*B**，*G*，*L*，*A*，*N*	6
	ATP 合酶亚基基因 Subunits of ATP synthase gene	*atpB*，*E*，*I*，*H*，*F**，*A*	6
	核酮糖二磷酸羧化酶大亚基基因 Large subunit of rubisco gene	*rbcL*	1
	翻译起始因子 Translation initiation factor	*infA*	1
其他基因 Other gene	ATP 依赖性蛋白酶亚基 p 基因 ATP-dependent protease subunit p gene	*clpP***	1
	成熟酶基因 Maturase gene	*matK*	1
	包裹酶蛋白基因 Envelope membrane protein gene	*cemA*	1
	乙酰辅酶 A 羧化酶亚基基因 Subunit of acetyl-CoA-carboxylase gene	*accD*	1
	c 型细胞色素合成基因 C-type cytochrome synthesis gene gene	*ccsA*	1
	假设的叶绿体阅读框 Hypothetical chloroplast reading frames(*ycf*)	*ycf*2a，*ycf*1，*ycf*4，*ycf*3**	5
总和 Total			130

*****. 一个内含子；******. 两个内含子；**a**. 重复基因。

*****. One intron; ******. Two introns; **a**. Duplicated gene.

2.2 IR 边界分析

通过比较木芙蓉 3 个品种、台湾芙蓉、朱槿、木槿叶绿体基因组的 IR/LSC 和 IR/SSC 边界区域的基因分布状况，识别 IR 的扩张或收缩。如图 2 所示，IR/LSC 和 IR/SSC 边界附近分布的基因包括 *rps*19、*rpl*2、*ycf*1、*ndhF*、*trnH*，木芙蓉 3 个品种与台湾芙蓉之间 IR 边界一致。6 条序列的 SSC/IRa 边界均为 *ycf*1 基因，在木芙蓉和台湾芙蓉 SSC 区长度均为 4 026 bp，而在朱槿和木槿的 SSC 区长度分别为 5 599 和 5 083 bp。*ndhF* 基因在 6 条序列中均位于 SSC 区内，其中木芙蓉和台湾芙蓉的 *ndhF* 基因距 SSC/IRb 边界均为 32 bp，其余两种距边界 150 bp。同样的，*rpl*2 基因在 6 条序列中均位于 IRb 区内，其中，木芙蓉和台湾芙蓉的 *rpl*2 基因距 LSC/IRb 边界均为 103 bp，朱槿距边界 67 bp，木槿距边界 113 bp。

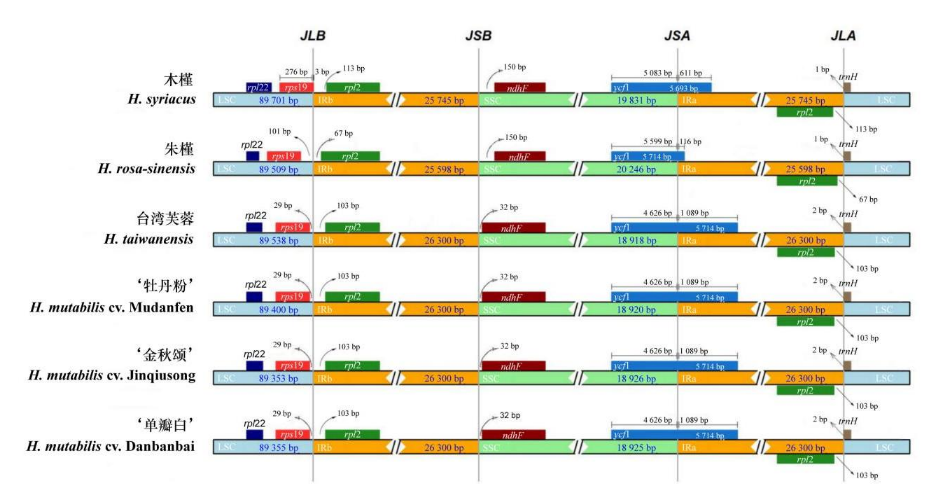


图 2 台湾芙蓉、木槿、朱槿与木芙蓉 3 个品种叶绿体基因组的反向重复区 (IR)、大单拷贝区 (LSC)、小

单拷贝区 (SSC) 边界对比

Fig. 2 Comparation of the junction between LSC, SSC and IR regions of chloroplast genome among *Hibiscus taiwanensis*, *H. syriacus*, *H. rosa-sinensis* and three cultivars of *H. mutabilis*

2.3 叶绿体微卫星分析和重复序列分析

微卫星序列 (microsatellite DNA)，也叫简单序列重复 (simple sequence repeats，SSR)，是 1 到 6 bp 的重复序列，广泛分布于叶绿体基因组。SSR 具有高度多态性和特异性，是研究基因流、种群遗传学和基因作图的有价值标记 (Chen et al., 2015)。本文中，我们分析了 6 种 SSR (单、二、三、四、五、六核苷酸 SSR) 在 6 条叶绿体基因组中的分布。如图 3 所示，数量最多的均为单核苷酸重复，占比从 66.67%到 74.55%不等，均比其他所有重复类型加起来还多。木芙蓉 3 个品种的 SSR 总数为 95，台湾芙蓉与其非常近似，为 96。作为对照，朱槿和木槿分别为 63 和 110，差异较大。木芙蓉 3 个品种和台湾芙蓉的基因组中存在六种完全微卫星序列，而朱槿和木槿中不存在六核苷酸重复。木芙蓉 3 个品种与台湾芙蓉的共同区别仅仅在于前者均只有 1 个五核苷酸重复，而后者存在 2 个五核苷酸重复。木芙蓉 3 个品种中，‘牡丹粉’明显区别于另外两种，‘牡丹粉’的单核苷酸重复比另外两种多一个，而六核苷酸重复比另外两种少一个。

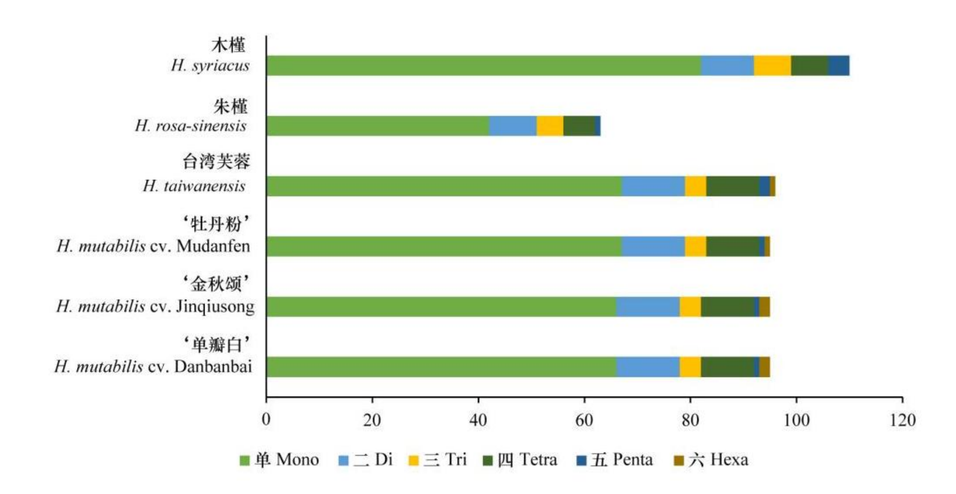
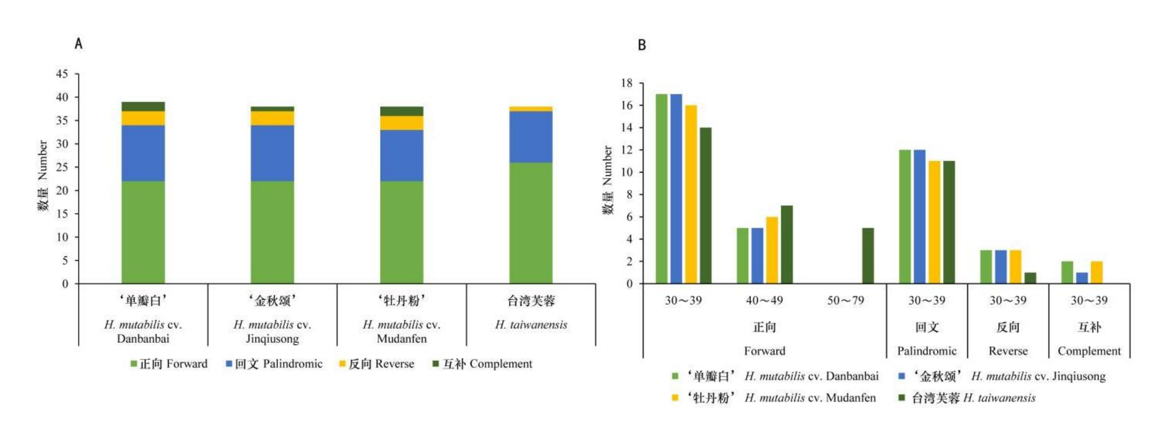


图 3 台湾芙蓉、朱槿、木槿与木芙蓉 3 个品种叶绿体基因组的微卫星分析(SSR)

Fig. 3 SSR analysis of chloroplast genome in *Hibiscus taiwanensis*, *H. rosa-sinensis*, *H. syriacus* and three cultivars of *H. mutabilis*

之前的研究表明重复的出现表示该位点是基因组重构的主要热点，这些重复对于开发种群遗传学研究中的遗传标记具有重要价值 (Bull et al., 1999)。重复序列有四种类型，即正向重(forward)、反向 (reverse)、互补 (complement)、回文(palindromic)。如图 4 所示，木芙蓉 3 个品种中均检测到四种类型的重复，而台湾芙蓉无互补重复；木芙蓉 3 个品种均为 22 个正向重复和 3 个反向重复，而台湾芙蓉的正向和反向重复分别为 26 和 1。木芙蓉 3 个品种间的四种重复的比例十分类似，但同时互相之间还是存在着差异。虽然三者的正向重复均为 22 个，但其构成略有差别，‘牡丹粉’重复单元长度为 30～39 和 40～49 的正向重复数量分别为 16 和 6，而其他两种都分别是 17 和 5；‘单瓣白’和‘金秋颂’的回文重复均为 12 个，而‘牡丹粉’为 11 个；‘单瓣白’和‘牡丹粉’的互补重复均为 2 个，而‘金秋颂’为 1 个。



A. 4 种重复序列类型的数量；**B**. 不同长度的重复序列数量。

A. Number of four repeat types; **B**. Number of repeat sequences by length.

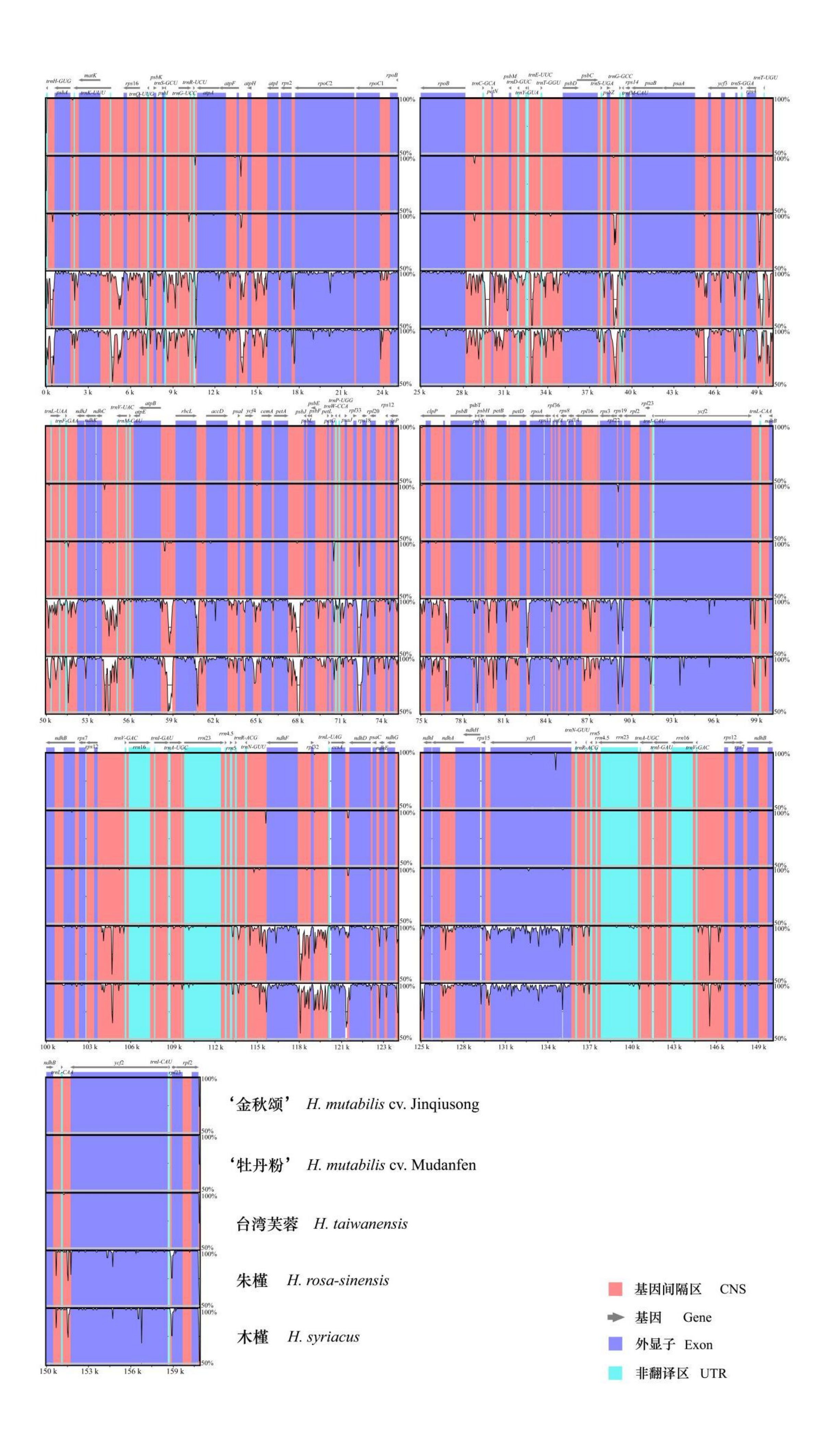
图 4　台湾芙蓉和木芙蓉 3 个品种叶绿体基因组的重复序列分析

Fig. 4 Analysis of repeated sequences of chloroplast genome in *Hibiscus taiwanensis* and three cultivars of *H. mutabilis*

2.4 核苷酸多态性分析

利用 mVISTA 在线程序，比对了木芙蓉 3 个品种和台湾芙蓉、朱槿、木槿的叶绿体基因组。其中，‘单瓣白’作为参考序列，朱槿和木槿则作为对照。从图 5 中可以明显观察到朱槿、木槿均与参考序列差异较大，而‘牡丹粉’、‘金秋颂’、台湾芙蓉则与参考序列差异较小。5 个 cp DNA 中高度分化的区域主要位于基因间隔区，但一些蛋白编码区如 *ycf*1 基因变异度也较大，而最保守的 4 个 rRNA 基因，在木芙蓉 3 个品种和台湾芙蓉中完全一致。

为了更加精确地反映木芙蓉 3 个品种之间以及与台湾芙蓉间的核苷酸多态性，我们分别计算了‘金秋颂’、‘牡丹粉’、台湾芙蓉的 CDS 和基因间隔区相对于参考序列单瓣白的核苷酸多样性值 (nucleotide diversity values, Pi)。如图 6 所示，CDS 序列较为保守，其 Pi 值普遍较小。仅就 CDS 序列来看，‘金秋颂’仅在 *ycf*1 基因处出现多态性，‘牡丹粉’仅在 *ndhB* 基因处出现，台湾芙蓉在 *accD*、*atpA*、*clpP*、*ndhB*、*ndhD*、*matK*、*ycf*1 均出现，但 Pi 值最大也不超过 0.001 7。而在基因间隔区中，台湾芙蓉有 14 个基因间隔区有差异，其中 *trnR-UCU~atpA*、*psbZ~trnG-GCC*、*infA~rps*8、*ndhE~ndhG* 这四个基因间隔区为台湾芙蓉的变异热点区域，其 Pi 值均不低于 0.004 18。且这四个高度可变的区域有 3 个在 LSC 区，有 1 个在 SSC 区，IR 区中 Pi 值较小，均小于 0.020 9。‘牡丹粉’有 3 个基因间隔区有多态性，其中 *psbZ~trnG-GCC*、*ycf*4*~cemA* 为牡丹粉的热点变异区域，且这 2 个热点都在 LSC 区。显然，IR 区的变异低于 LSC 区和 SSC 区。‘金秋颂’无基因间隔区差异。这些变异度较高的区域，可用于设计特定的 DNA 条形码。



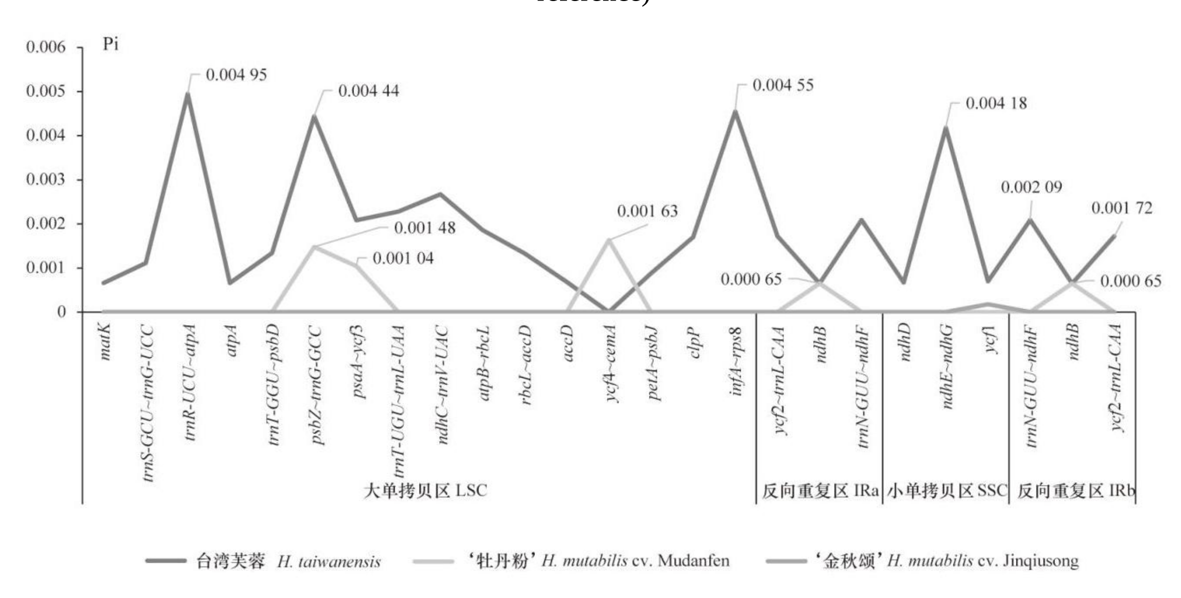
‘金秋颂’ H. mutabilis cv. Jinqiusong
‘牡丹粉’ H. mutabilis cv. Mudanfen
台湾芙蓉 H. taiwanensis
朱槿 H. rosa-sinensis
木槿 H. syriacus
基因间隔区 CNS
基因 Gene
外显子 Exon
非翻译区 UTR

Y 轴表示介于 50%到 100%之间平均的相似性百分比。

The Y axis represents the percent identity ranging from 50% to 100%.

图 5 6 个叶绿体基因组的序列相似度图（以单瓣白为参考）

Fig. 5 Sequence identity plot of the six chloroplast genomes(using *Hibiscus mutabilis* cv. Danbanbai as a reference)



X 轴表示蛋白编码基因和基因间隔区的名字；Y 轴表示核苷酸多样性值。

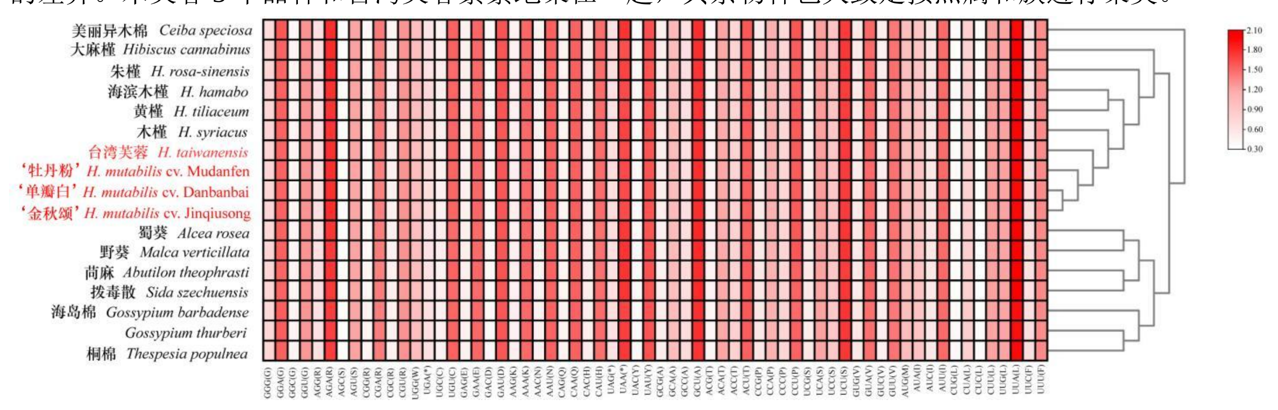
X axis represents the names of protein-coding genes and genes intergenic regions; Y-axis represents nucleotide diversity of each window.

图 6 台湾芙蓉、‘牡丹粉’、‘金秋颂’与‘单瓣白’之间的核苷酸多态性比较分析

Fig. 6 Comparative analysis of nucleotide variability among *Hibiscus taiwanensis*, *H. mutabilis* cv. Mudanfen, *H. mutabilis* cv. Jinqiusong and *H. mutabilis* cv. Danbanbai

2.5 选择压力分析和密码子偏好性分析

相对同义密码子使用度 (RSCU) 用于评估编码序列中同义密码子的使用情况，其中 RSCU 越大表示偏好性越强。我们选取了木芙蓉 3 个品种、台湾芙蓉以及其他 13 个相关物种，测定了每个物种叶绿体基因组的密码子的数量以及 RSCU。计算结果表明基因组中亮氨酸含量最高，异亮氨酸和甘氨酸其次，编码半胱氨酸的密码子数量最少，次少为色氨酸和丝氨酸。如图 7 所示，除色氨酸和甲硫氨酸外，所有氨基酸都使用两个或多个同义密码子，精氨酸和亮氨酸均由 6 个同义密码子表达。RSCU 值较大的密码子大部分为 A 或 U 结尾，即基因上的碱基 A/T，这与前人的研究结论一致，即植物中 A/T 结尾的密码子使用偏好 (Xie et al., 2018)。如图 7 所示，锦葵科植物的密码子偏好表现出较高的保守性，但不同属之间还是存在着一定的差异。木芙蓉 3 个品种和台湾芙蓉紧紧地聚在一起，其余物种也大致是按照属和族进行聚类。



红色和白色分别表示较高和较低的 RSCU 值。图的右边是物种间的系统发育关系。

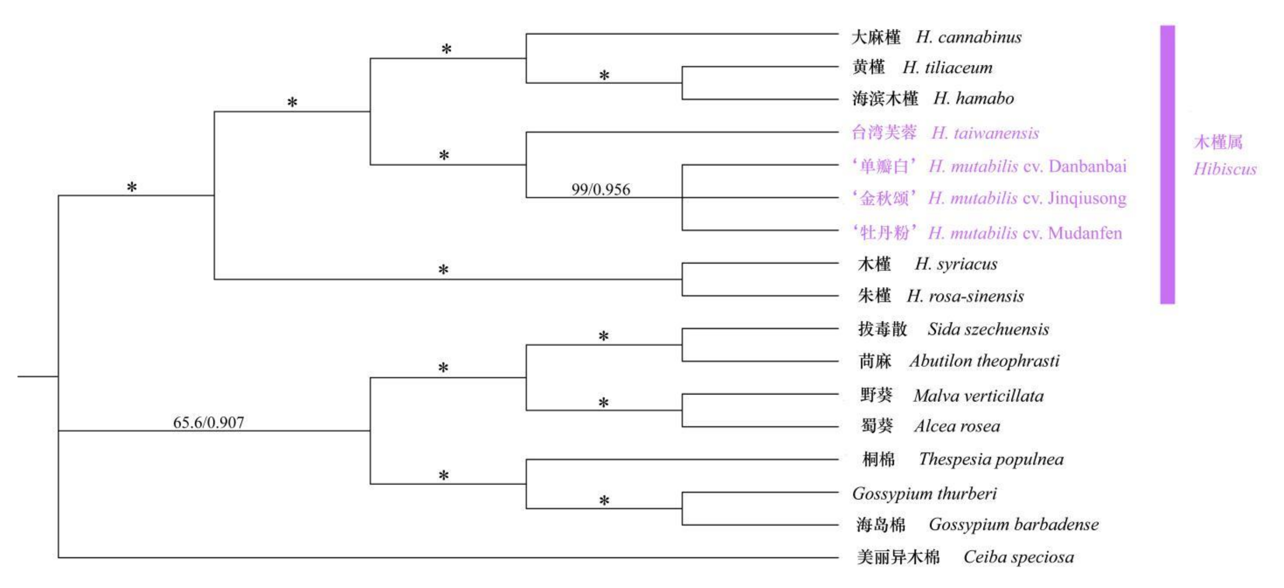
Red and white indicate higher and lower RSCU values, respectively. The right of the figure shows the phylogenetic relationship among species.

图 7 15 个物种 (含 3 个品种) 所有叶绿体基因组蛋白编码区 (CDS) 同义密码子的相对使用度 (RSCU)

Fig. 7 RSCU values of all protein-coding (CDS) genes for chloroplast genomes from 15 species (including three cultivars)

2.6 系统发育关系

我们选取 16 个锦葵科植物的叶绿体基因组来探讨木芙蓉与其近缘种间的亲缘关系，并以木棉科植物美丽异木棉 (*Ceiba speciosa*) 作为外类群。使用 17 个叶绿体基因组中共有的 76 个 CDSs 进行最大似然分析 (ML) 和贝叶斯分析 (BI)。结果显示，ML 和 BI 分析的拓扑结构完全相同，并且绝大部分的进化支都具有很高的后验概率 (posterior probabilities) 和自展值 (bootstrap values)。如图 8 所示，木芙蓉 3 个品种和台湾芙蓉同属于木槿属，并且聚在同一枝亲缘关系最近，自展值和后验概率均为最大值。



分支上的数字分别代表自展值和后验概率。* 代表两种分析为最大支持度。

The numbers on the branch are bootstrap support values and posterior probability. * represents maximum support in all two analyses.

图 8 基于 ML 和 BI 分析构建的 15 个物种（含 3 个品种）共有的 76 个蛋白编码序列系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic relationships of the 15 species (including 3 cultivars) inferred from ML and BI analyses based on 76 shared protein-coding genes

3 讨论与结论

3.1 木芙蓉及近缘种的叶绿体基因组比较

叶绿体基因组比较分析表明，木芙蓉的种下 3 品种及其近缘种台湾芙蓉在 cp DNA 上高度保守，反向重复区 (IR) 均为 26 300 bp，木芙蓉与该属的木槿和朱槿比较，后二者在 IR 区发生了收缩分别为 25 745 和 25 598 bp。3 个木芙蓉品种 cp DNA 上的大/小单拷贝区在长度上存在差异，且‘单瓣白’和‘金秋颂’差异更小，在大/小单拷贝区 (LSC/SSC) 长度上，‘单瓣白’、‘金秋颂’、‘牡丹粉’分别为 89 355bp/18 925bp、89 353bp/18 926bp、89 400bp/18 920bp。GC 含量是判断物种间亲缘关系的重要指标 (Li et al., 2018)，木芙蓉 3 个品种与台湾芙蓉的总 GC 含量、IR 区和 SC 区的 GC 含量均完全一致，木槿和朱槿的 GC 含量则有明显差异。此外，木芙蓉 3 个品种与台湾芙蓉的 IR 区边界分布的 *ycf*1、*trnH*、*ndhF*、*rpl*2、*rps*19 基因均未发生扩张或收缩，而同属的木槿和朱槿相对木芙蓉和台湾芙蓉发生了明显的波动。不同物种之间的 IR 边界是不同的，其中 IR 边界的波动是造成这种差异的主要原因 (Ravi et al., 2008)。因此，GC 含量和 IR 区边界的情况在较大程度上说明了木芙蓉与台湾芙蓉的亲缘关系非常之近，而木槿和朱槿的亲缘关系则相对较远。

同义密码子是由突变产生的，进化压力导致这些同义密码子的使用频率发生变化(Hanson & Coller, 2017)。密码子偏好性是物种对其碱基组成、tRNA 丰度和环境选择压力长期适应的结果(Novoa & de Pouplana, 2012; Behura & Severson, 2012)。此外，密码子偏好性会影响翻译的起始、延伸和准确性、mRNA 的剪切和蛋白质的折叠(任桂萍等，2019)。因此，密码子偏好性在一定程度上也能反映出亲缘关系。文中密码子偏好性聚类结果将台湾芙蓉与木芙蓉 3 个品种聚在一起，‘金秋颂’与‘单瓣白’的密码子偏好性无差异，‘牡丹粉’和台湾芙蓉相比前者编码亮氨酸密码子 UUA 的偏好性略高，其中台湾芙蓉还在缬氨酸和丝氨酸的密码子偏好上表现出差异，所以从密码子偏好性上我们也能判断出木芙蓉和台湾芙蓉的亲缘关系很近，且‘单瓣白’与‘金秋颂’最为近似。一些陆生植物，如花生、樱桃和萝卜等，叶绿体基因组的大小和结构，以及基因的含量和顺序，在栽培种和野生近缘物种中高度保守 (Cho et al., 2018; Wang et al., 2019)。木芙蓉 3 个品种与其近缘种台湾芙蓉进化特征高度保守，再次证实了这一结论。木芙蓉与台湾芙蓉形态上的差异非常小，区别仅为植株的毛被类型，而木芙蓉与木槿和朱槿在形态上则有较大的区别。木芙蓉与台湾芙蓉杂交坐果率较高，而与朱槿和木槿杂交坐果率很低甚至无法杂交成功。张露等 (2021) 在木芙蓉品种花粉的研究中根据形态将‘单瓣白’和‘金秋颂’聚在一起，而‘牡丹粉’聚在另一枝。因此，本文的研究结果验证了形态和育种上的事实，能够较好地研究进化特征和判断亲缘关系的远近。此外。木芙蓉 3 个品种是一个杂交组合，其中‘单瓣白’是‘金秋颂’的母本，二者最为近似，因此可以判断出木芙蓉的 cp DNA 为母系遗传，这为木芙蓉育种和遗传的研究打下了一定的理论基础。

3.2 木芙蓉及近缘种的叶绿体基因组系统发育关系

从系统发育树看，木槿属聚成了一个支持率非常高的单系类群，表明木槿属为一较为自然的分类群，系统发育树支持该属的建立。木芙蓉种下 3 个品种聚成一个支持率 99%的单系支，然后再与台湾芙蓉聚成一个高支持率（100%）分支，表明木芙蓉和台湾芙蓉的亲缘关系最近；从系统树看，海滨木槿、黄槿、大麻槿构成单系分支后，再与木芙蓉、台湾芙蓉构成的分支相聚；相较于木槿和朱槿，木芙蓉、台湾芙蓉两种与海滨木槿、黄槿、大麻槿在亲缘关系上更近。除了 cp DNA 的结构特征可以反映出木芙蓉 3 个品种与台湾芙蓉的亲缘关系外，系统发育分析能更直观的反映出这一关系。在系统发育树中，木芙蓉 3 个品种聚在一起，与其亲缘关系最近的为台湾芙蓉，与木槿和朱槿的亲缘关系则相对较远。此外，建树结果显示木槿属形成了一个单系。在冯国楣 (1984) 的分类处理中，他按照宏观形态将棉属和桐棉属归入木槿族。但彭焕文等 (2018) 在孢粉学研究表明，棉属、桐棉属与木槿属的花粉有较大差异，与锦葵族的一些物种花粉差异很小。本研究中，棉属、桐棉属与锦葵族聚在一起，而与木槿属分开，支持之前孢粉学的研究结果。系统发育分析结果表明叶绿体基因组数据对于研究系统发育问题是非常有效的。

3.3 木芙蓉及近缘种的叶绿体基因组分子条形码

从重复序列和核苷酸多样性分析中可以开发出候选分子标记和 DNA 条形码，可以作为品种鉴定的分子条码。我们筛选出了木槿属下种级、木芙蓉种下 3 个品种级 cp DNA 的候选特异性分子标记和 DNA 条形码，利用所选筛择的这些特异性的标记，可将种级水平物种区分开；再将其用于观赏花卉价值极高的木木芙蓉种下品种间，亦可将‘单瓣白’、‘金秋颂’、‘牡丹粉’这 3 个区分开。

微卫星和重复序列广泛存在于 cp DNA 中，可用于种群遗传学研究和分子标记的开发 (Bull et al., 1999; Chen et al., 2015)。木芙蓉的微卫星结构与木槿和朱槿有明显的区别，但与台湾芙蓉区别不太明显，且在木芙蓉品种内部，通过微卫星结构无法区分‘单瓣白’和‘金秋颂’。相比较而言，重复序列结构分析则能明显地区别台湾芙蓉和‘木芙蓉’，且能对木芙蓉 3 个品种进行明显区分。所以，重复序列分析能够更加有效地鉴定木芙蓉品种。叶绿体 DNA 条形码是指具有足够变异的短 DNA 序列，通常被认为有助于快速、准确地鉴定物种 (程芳婷等，2015)。通过核苷酸多态性分析我们筛选出了台湾芙蓉与木芙蓉之间的叶绿体 DNA 条形码，包括 *trnR-UCU~atpA*、*psbZ~trnG-GCC*、*infA~rps*8 和 *ndhE~ndhG*。也筛选出了木芙蓉 3 个品种之间的 DNA 条形码，分别为 *psbZ~trnG-GCC*、*ycf4~cemA*、*ndhB* 和 *ycf*1。可以看出大部分热点区域为基因间隔区，这是因为基因间隔区处于较弱的选择压力下，并且具有比基因更高的进化速度，它们更适合于低分类阶元的系统发育和进化研究(陈士林等，2009)。台湾芙蓉与‘单瓣白’差异最大，有 7 个基因和 14 个基因间隔区出现不同程度的差异。‘牡丹粉’与‘单瓣白’之间的差异仅有一个 *ndhB* 基因和 3 个基因间隔区。*ndhB* 基因属于 NADH 脱氢酶基因，其缺失突变会导致光合作用中碳同化能力严重下降，植物

可以通过对该类基因进行 RNA 编辑来保证光调节作用（刘佳等，2019)。有研究证明大豆的 *ndhB* 基因在水稻中超表达，提高了水稻的光合效率，进而影响了水稻的农艺性状（王晓曼，2016)。因此，我们推断‘牡丹粉’花径很大，花量更多，植株也更高大，或许与 *ndhB* 基因的改变有关。‘金秋颂’与‘单瓣白’差异最小，仅有一个蛋白编码基因 *ycf*1 基因发生替换。*ycf*1 基因是具有未知功能的开放阅读框，但是烟草基因敲除实验证明 *ycf*1 基因编码对细胞存活至关重要的产物(Drescher et al., 2000)。与其他叶绿体基因相比，*ycf*1 基因进化速度快，因此也是植物中非常有用的分子标记，能够揭示低分类水平上的系统发育关系(Amar, 2020)。因此，木芙蓉品种之间以及与近缘种之间也可以通过一些基因间隔区和个别特殊基因（如 *ycf*1、*ndhB*）进行快速、准确地鉴定。

参考文献：

ABDULLAH, MEHMOOD TW, FURRUKH M, et al., 2021. Correlations among oligonucleotide repeats, nucleotide substitutions, and insertion-deletion mutations in chloroplast genomes of plant family Malvaceae[J]. J Syst Evol, 59(2): 388-402.

AMAR MH, 2020. *ycf*1-*ndhF* genes, the most promising plastid genomic barcode, sheds light on phylogeny at low taxonomic levels in *Prunus persica*[J]. J Genet Eng Biotechnol, 18(1): 531-547.

AMAR MH, MAGDY M, WANG L, et al., 2019. Peach chloroplast genome variation architecture and phylogenomic signatures of cp DNA introgression in *Prunus*[J]. Can J Plant Sci, 9(6): 885–896.

AMIRYOUSEFI A, HYVONEN J, POCZAI P, et al., 2018. Irscope: An online program to visualize the junction sites of chloroplast genomes[J]. Bioinformatics, 34(17): 3030–3031.

BEHURA SK, SEVERSON DW, 2012. Codon usage bias: Causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: With emphasis on insect genomes[J]. Biol Rev, 88(1): 49–61.

BEIER S, THIEL T, MUNCH T, et al., 2017. MISA-web: a web server for microsatellite prediction[J]. Bioinformatics, 33(16): 2583–2585.

BULL LN, PABON-PENA CR, FREIMER NB, 1999. Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features[J]. Genome Res, 9(9): 830–838.

CAI L, ZENG XM, WANG X, et al., 2021. Analysis and assessment of amino acid component in flowers of *Hibiscus mutabilis* L. among different cultivars[J]. Sci Technol Food Ind, 42(20): 279−285. [蔡露，曾心美，王希，等, 2021. 不同品种木芙蓉花氨基酸组成分析及评价[J]. 食品工业科技, 42(20): 279−285.]

CHEN JH, HAO ZD, XU HB, et al., 2015. The complete chloroplast genome sequence of the relict woody plant *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng[J]. Front Plant Sci, 6(June): 447.

CHEN SL, SONG JY, YAO H, et al., 2009. Strategy and key technique of identification of Chinese herbal medicine using DNA barcoding[J]. Chin J Nat Med, 7(5): 322–327. [陈士林，宋经元，姚辉，等, 2009. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析[J]. 中国天然药物, 7(5): 322–327.]

CHENG FT, LI ZH, LIU CY, et al., 2015. DNA barcoding of the genus *Rehmannia* (Scrophulariaceae)[J]. Plant Sci J, 33(1): 25-32. [程芳婷，李忠虎，刘春艳，等, 2015. 地黄属植物的 DNA 条形码研究[J]. 植物科学学报, 30(5): 468-475.]

CHO MS, YOON HS, KIM SC, 2018. Complete chloroplast genome of cultivated fowering cherry, *Prunus* x *yedoensis* ‘*Somei-yoshino*’ in comparison with wild *Prunus yedoensis* Matsum. (Rosaceae)[J]. Mol Breed, 38(9): 112.

DIERCKXSENS N, MARDULYN P, SMITS G, 2017. NOVOPlasty: De novo assembly of organelle genomes from whole genome data[J]. Nucl Acid Res, 45(4): e18.

DRESCHER A, RUF S, CALSA T, et al., 2000. The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes[J]. Plant J, 22(2): 97–104.

FENG GM, 1984. Flora of China [M]. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 49(2): 1-102.

GREINER S, LEHWARK P, BOCK R, 2019. Organellar Genome DRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes[J]. Nucl Acid Res, 47(W1): W59-W64.
HANSON G, COLLER J, 2017. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 19(1): 20–30.
IVICA L, PEER B, 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. Nucl Acid Res, 49(W1): 293-296.
KEARSE M, MOIR R, WILSON A, et al., 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data[J]. Bioinformatics, 28(12): 1647-1649.
KURTZ S, CHOUDHURI JV, OHLEBUSCH E, et al., 2001. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale[J]. Nucl Acid Res, 29(22): 4633-4642.
LI HE, GUO QQ, ZHENG WL, 2018. Characterization of the complete chloroplast genomes of two sister species of *Paeonia*: genome structure and evolution[J]. Conserv Genet Resour, 10(2): 209-212.
LIBRADO P, ROZAS J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J], Bioinformatics, 25(11): 1451-1452.
LIM TK, 2014. *Hibiscus taiwanensis*[M]//LIM TK. Edible medicinal and non-medicinal plants. New Delhi: Springer Netherlands, 8: 381–384.
LIU J, SONG YJ, SUN JY, et al., 2019. Identification and analysis of RNA editing sites of *ndhA*, *ndhB*, *ycf*3, *atpA* and *rps*8 genns in sweet potato and its two wild species[J]. J Jiangsu Norm Univ(Nat Sci Ed), 37(2): 15-20. [刘佳，宋艳捷，孙健英，等, 2019. 甘薯及 2 个近缘野生种 *ndhA*, *ndhB*, *ycf*3, *atpA* 和 *rps*8 基因 RNA 编辑位点的鉴定与分析[J]. 江苏师范大学学报(自然科学版), 37(2): 15-20.]
MAYOR C, BRUDNO M, SCHWARTZ JR, et al., 2000. VISTA: visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length[J]. Bioinformatics, 16(11): 1046-1047.
MU LS, HE Y, LUO A, et al., 2017. Progress on application of plastid genetic engineering in plant breeding [J]. J Henan Agric Sci, 46(6): 1-12. [母连胜，何勇，罗岸，等, 2017. 质体基因工程在植物育种中的应用研究进展[J]. 河南农业科学期刊，46(6): 1-12.]
NEALE DB, SEDEROFF RR, 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine[J]. Theor Appl Genet, 77(2): 212–216.
NOVOA EM, DE POUPLANA LR, 2012. Speeding with control: Codon usage, tRNAs, and ribosomes[J]. Trends Genet, 28(11): 574–581.
PENG HW, ZHOU SD, HE XJ, 2018. Pollen morphology of 26 Taxa from 15 genera of Malvaceae in China and its systematic significance[J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 38(10): 1832-1845. [彭焕文，周颂东，何兴金, 2018. 中国锦葵科 15 属 26 个分类群植物花粉形态及其系统学意义[J]. 西北植物学报, 38(10): 1832-1845.]
PENG J, ZHAO YL, DONG M, et al., 2021. Exploring the evolutionary characteristics between cultivated tea and its wild relateds using complete chloroplast genomes[J]. BMC Ecol Evol, 21(1): 71.
RAVI V, KHURANA JP, TYAGI AK, et al., 2008. An update on chloroplast genomes[J]. Plant Syst Evol, 271(1-2): 101–122.
REN GP, DONG YY, DANG YK, 2019. Codon codes: Codon usage bias influences many levels of gene expression[J]. Sci Sin Vit, 49(7): 839–847. [任桂萍，董璎莹，党云琨, 2019. 密码子中的密码:密码子偏好性与基因表达的精细调控[J]. 中国科学:生命科学, 49(7): 839-847.]
SHARP PM, LI WH, 1987. The codon adaptation index–a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications[J]. Nucl Acid Res, 15(3): 1281-1295.
SHI XQ, LI FW, LIU XL, et al., 2021. Study on Adaptability of *Hibiscus mutabilis* germplasm resources in Chengdu region[J]. J Sichuan For Sci Technol, 42(4): 90-93. [石小庆，李方文，刘晓莉，等, 2021. 木芙蓉种质资源在成都地区的适应性研究[J]. 四川林业科技, 42(4): 90-93.]
TILLICH M, LEHWARK P, PELLIZZER T, et al., 2017. GeSeq – versatile and accurate annotation of organelle genomes[J]. Nucl Acid Res, 45: W6-W11.

WANG J, LI Y, LI CJ, et al., 2019. Twelve complete chloroplast genomes of wild peanuts: great genetic resources and a better understanding of Arachis phylogeny[J]. BMC Plant Biol, 19(1): 504.

WANG Y, 2017. Research status and prospects of *Hibiscus mutabilis*[J]. J Sichuan For Sci Technol, 38(5): 124-127. [王莹, 2017. 芙蓉花研究现状及展望[J]. 四川林业科技, 38(5): 124-127.]

WANG Y, FENG LP, HUANG LL, et al., 2021. Rapid identification on chemical constituents of *Hibiscus mutabilis* flowers by UPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. Nat Prod Res Dev, 33(12): 2042-2052. [王艺, 冯丽萍, 黄李璐, 等, 2021. UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术快速鉴定木芙蓉花化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 33(12): 2042-2052.]

WANG XM, 2016. Agronomic traits and salt tolerance of soybean-NDHB subunit-overexpressed rice line[D]. Hangzhou: Zhejiang University. [王晓曼, 2016. 大豆 NDHB 亚基超表达水稻的农艺性状和抗盐性[D]. 杭州：浙江大学.]

XIE DF, YU Y, DENG YQ, et al., 2018. Comparative analysis of the chloroplast genomes of the Chinese endemic genus *Urophysa* and their contribution to chloroplast phylogeny and adaptive evolution[J]. Int J Mol Sci, 19(7): 1847.

XU XR, ZHOU SD, SHI XQ, 2019. The complete chloroplast genome of *Hibiscus taiwanensis* (Malvaceae)[J]. Mitochondrial DNA Part B, 4(2): 2532-2533.

YANG QQ, JIANG M, WANG LQ, et al., 2019. Complete chloroplast genome of *Allium chinense*: comparative genomic and phylogenetic analysis[J]. Acta Pharm Sin, 54(1): 173-181. [杨俏俏, 姜梅, 王立强, 等, 2019. 药食两用藠头叶绿体基因组解析、比较基因组学及系统发育研究[J]. 药学学报, 54(1): 173-181.]

YANG YZ, ZENG XM, MA J, et al., 2019. Observation and analysis of flowering characteristics of different early flowering cultivars of *Hibiscus mutabilis* Linn[J]. Mod Agric Sci Technol, (17):144-145. [杨苑钊, 曾心美, 马娇, 等, 2019. 木芙蓉不同早花品种花期特征观察与分析[J]. 现代农业科技, (17):144-145.]

ZHANG D, LI WX, JAKOVLIĆ I, et al., 2020. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies[J]. Mol Ecol Resour, 20(1): 348-355.

ZHANG L, ZHANG MY, ZHEN XM, et al., 2021. Pollen morphology of 19 cultivars of *Hibiscus mutabilis* in Chengdu and its taxonomic significance[J]. J Trop Subtrop Bot, 29(4): 421-429. [张璐, 张曼瑜, 曾心美, 等, 2021. 成都地区 19 个木芙蓉品种的孢粉学研究及其分类学意义[J]. 热带亚热带植物学报, 29(4): 421-429.]

ZHENG P, SHI HW, DENG HB, et al., 2012. Study on the ecological functions of sixty-five garden species in Wuhan City, China[J]. Plant Sci J, 30(5): 468-475. [郑鹏, 史红文, 邓红兵, 等, 2012. 武汉市 65 个园林树种的生态功能研究[J]. 植物科学学报, 30(5): 468-475.]